

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年3月11日 (11.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/020397 A1(51) 国際特許分類:  
5/062, G01N 33/53, 33/531

C07C 235/20, C07K

LTD.) [JP/JP]; 〒530-0004 大阪府 大阪市 北区堂島浜  
1丁目3番23号 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010394

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2003年8月18日 (18.08.2003)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西井 重明

(25) 国際出願の言語: 日本語

(NISHII, Shigeaki) [JP/JP]; 〒914-0047 福井県 敦賀市

(26) 国際公開の言語: 日本語

東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ

(30) 優先権データ:  
特願2002-251616 2002年8月29日 (29.08.2002) JP

研究所内 Fukui (JP). 松井 一裕 (MATSUI, Kazuhiro)

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東洋紡績株式会社 (TOYO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒530-8230 大阪府 大阪市 北区堂島浜二丁目2番8号 Osaka (JP). 株式会社タクマ (TAKUMA CO.,

[JP/JP]; 〒914-0047 福井県 敦賀市 東洋町10番

24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

Fukui (JP). 石橋 卓也 (ISHIBASHI, Takuya) [JP/JP]; 〒

914-0047 福井県 敦賀市 東洋町10番24号 東洋

紡績株式会社敦賀バイオ研究所内 Fukui (JP). 岡 正

則 (OKA, Masanori) [JP/JP]; 〒914-0047 福井県 敦賀

市 東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイ

オ研究所内 Fukui (JP). 藤平 弘樹 (FUJIHARA, Hiroki)

[JP/JP]; 〒676-8540 兵庫県 高砂市 荒井町新浜1丁目

2番1号 株式会社タクマ内 Hyogo (JP). 三嶋 弘次

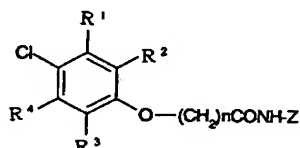
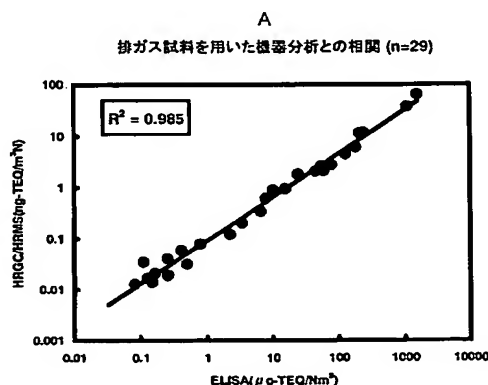
(MISHIMA, Hirotsugu) [JP/JP]; 〒676-8540 兵庫県 高

砂市 荒井町新浜1丁目2番1号 株式会社タクマ内

[続葉有]

(54) Title: STANDARD COMPOUND FOR IMMUNOASSAY FOR DIOXIN AND METHOD OF IMMUNOASSAY FOR DIOXIN

(54) 発明の名称: ダイオキシン類の免疫測定用標準品及びダイオキシン類の免疫測定法



(1)

A...CORRELATION WITH INSTRUMENTAL ANALYSIS OF FLUE GAS  
SAMPLE (n=29)

(57) Abstract: A compound represented by the following general formula (1); and a method of immunoassay for determining the dioxins contained in a test sample, in which a compound represented by the following general formula (1) is used as a standard compound. (1) (In the formula, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, and R<sup>4</sup> are the same or different and each represents chlorine or hydrogen; n is an integer of 1 to 10; and Z represents an amino acid residue or peptide.)

[続葉有]



Hyogo (JP). 片岡 静夫 (KATAOKA, Shizuo) [JP/JP]; 〒676-8540 兵庫県 高砂市 荒井町新浜 1 丁目 2 番 1 号 株式会社タクマ内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 三枝 英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.); 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修町 1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

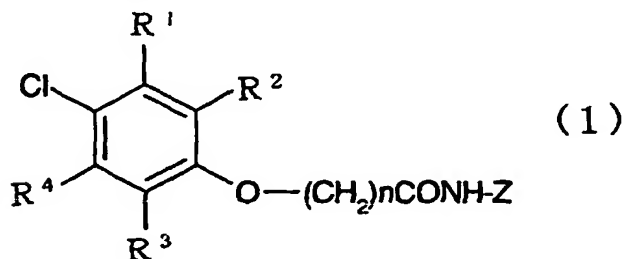
添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

以下の一般式 (1) で表される化合物、及び、被験試料中のダイオキシン類を定量するための免疫測定法であって、以下の一般式 (1) で表される化合物を標準品として使用する方法。



(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 $n$ は1～10の整数を表し、 $Z$ はアミノ酸残基又はペプチドを表す。)

## 明 細 書

## ダイオキシン類の免疫測定用標準品及びダイオキシン類の免疫測定法

5

技術分野

本発明は、ダイオキシン類の免疫測定に供される標準品に関する。また本発明は、この標準品を用いたダイオキシン類の免疫測定法、さらに詳しくは、大気、排ガス、土壌、河川、燃焼灰などの中のダイオキシン類の濃度または毒性等量（TEQ）を、ダイオキシンアナログを標準品として用いることにより算出する方法

10 に関する。

背景技術

15 ダイオキシン類とは、ポリ塩素化ジベンゾ-*p*-ダイオキシン類（polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins:PCDDs）、ポリ塩素化ジベンゾフラン類（polychlorinated dibenzofurans:PCDFs）、及びコプラナーPCB（coplanar polychlorinated biphenyl:Co-PCBs）の総称である。

20 これら3種類の骨格構造について、塩素置換位置の異なる多数の異性体群が存在する。このうち、PCDDs及びPCDFsでは、2、3、7及び8位に塩素置換がある異性体は強い毒性を有しており、塩素による皮膚炎、多発性神経症、眼球振とう症、肝機能不全などの症状を引き起こすことが知られている。

また、低濃度のダイオキシンであっても長期間曝露することにより、晩発性皮膚ポルフィリン症などの慢性的な症状を引き起こす他、催奇形性、発ガン性、助

25 ガン性といった多種多様な毒性を示すことも知られている。

更に、近年、人や野生動物の内分泌機能を攪乱する作用を持つ、いわゆる「内分泌攪乱物質」が世界的な環境問題としてクローズアップされている。ダイオキシン類もエストロゲン活性を有する内分泌攪乱物質の一つである疑いがあること

も判明している。

このように様々な毒性を持つダイオキシン類が、除草剤や殺虫剤などの化学製品、ゴミ焼却場から出る排ガスやフライアッシュ、製紙工場から排出される廃水の中などに含まれていることが明らかとされている。このため、大都市周辺の河川や港湾の水質や底質、大気、土壌といった環境試料のみならず、食品、血液、母乳、尿といった生体試料からもダイオキシン類が検出されている。このように、汚染が環境中に広範囲に広がっていることが大きな社会問題になっていることから、環境中のダイオキシン類暴露量を把握することが急務である。

ダイオキシン類の測定は精度の高い分析値が要求される。このため、各種のクロマトグラフィーにより、ダイオキシン類を抽出、濃縮、精製した後、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計などの高価な分析装置等の機器を用いる公定分析法が採用されている。これらの分析法は高感度であるとともに、複数の化合物を一度に同定、定量できる多成分分析が可能である。その反面、高価で特殊な機器やクリーンルーム等の設備投資が必要であること、分析にも熟練した技術者が求められること、前処理の煩雑さのために結果を得るまでに時間がかかること等の難点があるのが現状である。

このため、精度が高くかつ簡便なダイオキシン類の測定方法の開発が望まれている。このような問題を解決すべく、抗体を用いた免疫測定法による環境汚染物質の検出技術が注目されている。

免疫測定法とは、抗体が抗原を特異的に認識する能力を用いて微量の抗原を検出又は定量する方法であり、抗体の抗原に対する高い親和性と高い特異性により抗原を高感度に測定することができる。このため、試料の前処理も簡便であり、多検体の測定を簡易かつ迅速に行なうことができ、測定に要するコストが低いといった種々のメリットを持ち、医学、生化学、薬学、農学など広い分野で利用されている。免疫測定法において測定対象物質を検出又は定量するには、抗体または抗原を標識する必要がある種々の標識法が開発されている。中でも酵素を用いた酵素免疫測定法（EIA）は、その簡便性から臨床検査や生化学分野での生体試料中の目的成分の定量に広く応用されている。EIAは、抗原抗体反応の形式により、競合法と非競合法に大別できるが、ダイオキシン類のような低分子化合物

は通常競合法によって測定される。

E I Aにおいては、測定対象と同じ化合物を標準品に用いて検体と同様に測定し、得られた標準曲線から試料中の化合物濃度を算出する。しかしながら、ダイオキシン類は3種の基本骨格を有する化合物群についての塩素置換数の異なった異性体類の総称であるため、どの化合物を標準品にするかが問題となる。

ダイオキシン類の毒性は各同族体及び異性体により異なるため、毒性の異なる同族体及び異性体の混合物であるダイオキシン類の毒性の強さは、個々の異性体の存在比率に依存することになり、単純に各異性体量を合計しても、ダイオキシン類の毒性を正しく表現したことにはならない。

これまでに開発されたダイオキシンE I A測定系の多くは、最も毒性が高い2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン(2, 3, 7, 8-TeCDD)を標準試料として用いている(Anal. Chem. 70, 1092-1099)。各異性体の毒性は、2, 3, 7, 8-TeCDDの毒性を1としこれに対する相対値である毒性等価係数(TEF: Toxic Equivalency Factor)で表される。さらに、個々の異性体ごとにその存在量にTEFを乗じて得られる毒性量を算出する。これが、測定対象に含まれる全ての異性体の全毒性量である毒性等量(TEQ: Toxic Equivalent)である。

したがって、2, 3, 7, 8-TeCDDを主に測定するE I A測定系では、ダイオキシン類の毒性を正確に測定できる系とはいえない。特にダイオキシン類の主要な発生源である廃棄物焼却炉から排出されるガス中のダイオキシン類毒性等量(TEQ)は、2, 3, 7, 8-TeCDDよりも、五塩素化ジベンゾフラン濃度又は六塩素化ジベンゾフラン濃度と相関が高いことが知られている。また、排ガス試料を分析対象とした場合、これまでのE I A測定系では、機器分析値と大きくかけ離れる場合がある。このように、E I A測定系は、使用に制限が生じる可能性がある。

また、E I Aにおいて、2, 3, 7, 8-TeCDDやその他のダイオキシン類異性体を標準品に用いる場合は、標準品調製時に毒性の高い化合物を取り扱うことになるため、測定者側の安全性確保及び作業時の精神的な負担等の問題が生じる。

従って、被験試料中のダイオキシンの定量のための標準品として毒性を有さない化合物が求められていること、例えば特開2002-128731、特開2002-131316及び特開2002-155023には標準品としてクロロフェノール誘導体を使用することが記載されている。

5

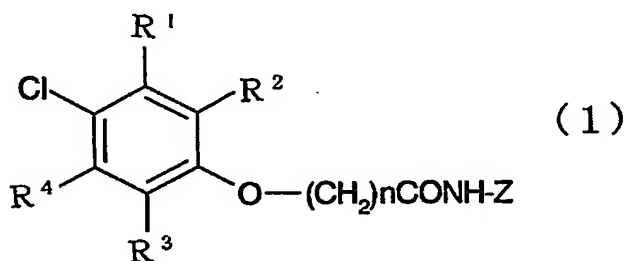
### 発明の開示

本発明の目的は、ダイオキシン類の免疫測定用標準品であって毒性等価係数(T E F)を有さない標準品、及び、この標準品を用いて環境試料中のダイオキシン類濃度または毒性等量を簡便かつ高感度に測定できる免疫測定法を提供することである。

10

本発明者は、上記事情に鑑み、鋭意検討した結果、以下の知見を得た。

(i) 下記一般式(1)で表されるクロロフェノール誘導体



15

(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 $n$ は1～10の整数を表し、 $Z$ はアミノ酸残基又はペプチドを表す。)をダイオキシン類の標準品として使用して、免疫測定法により被験試料中のダイオキシン濃度を測定し算出した毒性等量は、試料中に含まれる各ダイオキシン化合物の濃度を測定する公定法により求めた毒性等量と高い相関性が認められる。

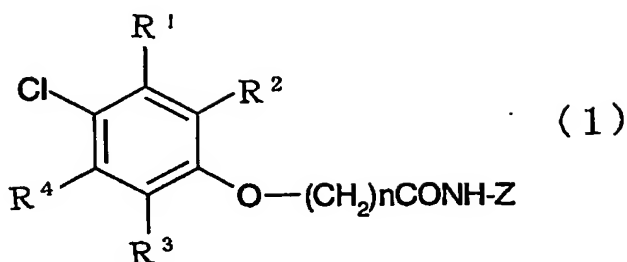
20

(ii) このクロロフェノール誘導体は毒性等価係数(T E F)を有さないため、この化合物をダイオキシン類測定用標準品として用いることにより、安全に環境試料中のダイオキシン類濃度及び毒性等量を算出できる。

本発明は前記知見に基づき完成されたものであり、以下の化合物などを提供する。

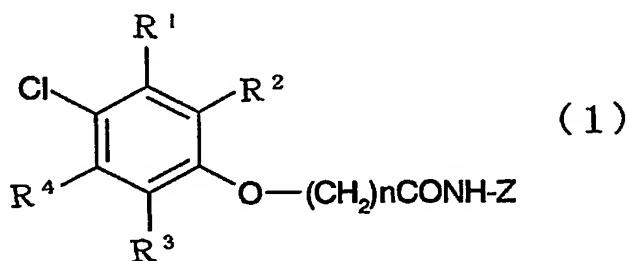
25

1. 以下の一般式(1)で表される化合物。



(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 $n$ は1～10の整数を表し、 $Z$ はアミノ酸残基又はペプチドを表す。)

2. 以下の一般式(1)で表されるダイオキシン類の免疫測定用標準品。



(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 $n$ は1～10の整数を表し、 $Z$ はアミノ酸残基又はペプチドを表す。)

3. 項1に記載の化合物を含むダイオキシン類の免疫測定用キット。

4. さらに、抗ダイオキシン抗体を含む項3に記載のキット。

10 5. さらに、競合用抗原を含む項3又は4に記載のキット。

6. ダイオキシン類を定量するための免疫測定法であって、項1に記載の化合物を標準品として用いる方法。

7. 免疫測定法が、酵素免疫測定法、放射性免疫測定法及び蛍光免疫測定法から選ばれる方法である項6に記載の方法。

15 8. 被験試料中のダイオキシン類の濃度又はさらに毒性等量を算出するための免疫測定法であって、項1に記載の化合物を標準品として用いる方法。

9. 免疫測定法が、酵素免疫測定法、放射性免疫測定法及び蛍光免疫測定法から選ばれる方法である項8に記載の方法。

20 10. 被験試料と抗ダイオキシン抗体とを反応させることにより、抗原抗体反応量を測定する工程(1)と、

工程(1)における抗原抗体反応量を、濃度既知の請求項1に記載の化合物と抗ダ

イオキシシ抗体とを反応させることにより得られた抗原抗体反応量と比較することにより被験試料中に含まれるダイオキシシ類濃度を算出する工程(2)とを含むダイオキシシ類の免疫測定法。

- 1 1. 抗原抗体反応量を、酵素免疫測定法、放射性免疫測定法及び蛍光免疫測定法から選ばれる方法で測定する項10に記載の方法。

本発明により、ダイオキシシ類の免疫測定用標準品であって毒性等価係数(T E F)を有さない標準品、及び、この標準品を用いて環境試料中のダイオキシシ類濃度または毒性等量を簡便かつ高感度に測定できる免疫測定法が提供された。

- 10 詳述すれば、本発明の一般式(1)で表される免疫測定用標準品を用いて定量した試料中ダイオキシシ類濃度及びこれから算出した毒性等量は、機器分析により毒性等価係数を有するダイオキシシ類化合物濃度を測定する公定法により得られる毒性当量と良好な相関性を示す。このように、ダイオキシシ類定量用の標準品として本発明化合物を用いれば、被験試料の毒性等量を正確かつ高感度に測定できる。このことから、従来のE I Aに較べて、被験試料中のダイオキシシ類の  
15 毒性量を正確に評価することができる。

また従来の公定法では、毒性等量を有する29種類のダイオキシシ類濃度を測定しTEQ値を算出する必要があり毒性等量の評価に長時間を要する。これに対して本願化合物を用いた免疫測定法では比較的短時間で毒性等量を評価できる。

- 20 また、本発明の標準品はWHOがその毒性等価係数を定めていないため、毒性のない化合物であると考えられる。また、本願の化合物は市販化合物であるクロロフェノール(例えば2,4,5-トリクロロフェノール)にメチレン鎖及びペプチドを付加した誘導体であり、この点からも毒性がないことは明らかである。このことから、本願化合物を用いることによりダイオキシシ類の免疫測定作業時の安全性を大幅に向上させることができる。

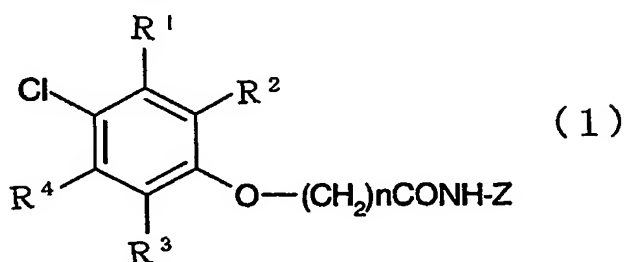
- 25 以上のことから本発明の化合物及び方法は環境分析等に広く応用することができ、食品、母乳、血液、尿のような生体試料の分析においても有用である。

以下、本発明を詳細に説明する。

### (I) 本発明の化合物

#### 基本的構成

以下の一般式 (1) で表される化合物は、文献未記載の新規化合物である。



(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 $n$ は1～10の整数を表し、 $Z$ はアミノ酸残基又はペプチドを表す。)

#### 好ましい化合物

上記一般式 (1) で表される化合物について、塩素置換数及び置換位置は特に限定されないが、抗ダイオキシン抗体との反応性から、全置換塩素数が3以上である化合物が好ましく、全置換塩素数が3である化合物がより好ましい。

全置換塩素数が3である化合物の中でも、 $R^1$ 、 $R^2$ が塩素原子を表し $R^3$ 及び $R^4$ が水素原子を表す化合物； $R^1$ 、 $R^3$ が塩素原子を表し $R^2$ 及び $R^4$ が水素原子を表す化合物； $R^2$ 、 $R^3$ が塩素原子を表し $R^1$ 及び $R^4$ が水素原子を表す化合物； $R^2$ 、 $R^4$ が塩素原子を表し $R^1$ 及び $R^3$ が水素原子を表す化合物； $R^3$ 、 $R^4$ が塩素原子を表し $R^1$ 及び $R^2$ が水素原子を表す化合物が好ましく、 $R^2$ 、 $R^3$ が塩素原子を表し $R^1$ 及び $R^4$ が水素原子を表す化合物； $R^2$ 、 $R^4$ が塩素原子を表し $R^1$ 及び $R^3$ が水素原子を表す化合物がより好ましく、 $R^2$ 、 $R^4$ が塩素原子を表し $R^1$ 及び $R^3$ が水素原子を表す化合物が最も好ましい。

$n$ は0～20程度の整数、特に2～6程度の整数であることが好ましい。最も好ましいのは $n=2$ である。ポリメチレン鎖の長さ即ち $n$ が上記範囲であれば合成を容易に行える。

$Z$ のアミノ酸残基又はペプチドは、通常のパプチドの定義に従い構成アミノ酸残基数が100残基以内のものであれば特に限定されないが、通常1～50残基程度、特に1～10残基程度、さらに特に1～4残基程度、さらに特に1～3残基程度の

アミノ酸又はペプチドが好ましい。ペプチドが余りに長いと水溶性が増大するため測定時に有機溶媒に溶解させることが困難になり反応液中で沈殿が生じる場合があるが、上記範囲であればこのような問題は生じない。

具体的には、 $R^1$ 、 $R^2$ が塩素原子を表し $R^3$ 及び $R^4$ が水素原子を表し、 $n$ が2  
5 ～6であり、 $Z$ がアミノ酸残基数1～4程度のペプチドである化合物； $R^1$ 、 $R^3$   
が塩素原子を表し $R^2$ 及び $R^4$ が水素原子を表し、 $n$ が2～6であり、 $Z$ がアミノ  
酸残基数1～4程度のペプチドである化合物； $R^2$ 、 $R^3$ が塩素原子を表し $R^1$ 及び  
 $R^4$ が水素原子を表し、 $n$ が2～6であり、 $Z$ がアミノ酸残基数1～4程度のペ  
10 プチドである化合物； $R^2$ 、 $R^4$ が塩素原子を表し $R^1$ 及び $R^3$ が水素原子を表し、  
 $n$ が2～6であり、 $Z$ がアミノ酸残基数1～4程度のペプチドである化合物； $R^3$ 、  
 $R^4$ が塩素原子を表し $R^1$ 及び $R^2$ が水素原子を表し、 $n$ が2～6であり、 $Z$ がアミ  
ノ酸残基数1～4程度のペプチドである化合物が好ましい化合物として例示でき  
る。

中でも、 $R^2$ 、 $R^3$ が塩素原子を表し $R^1$ 及び $R^4$ が水素原子を表し、 $n$ が2～6  
15 であり、 $Z$ がアミノ酸残基数1～4程度のペプチドである化合物； $R^2$ 、 $R^4$ が塩  
素原子を表し $R^1$ 及び $R^3$ が水素原子を表し、 $n$ が2～6であり、 $Z$ がアミノ酸残基  
数1～4程度のペプチドである化合物が好ましい。

特に、 $R^2$ 、 $R^4$ が塩素原子を表し $R^1$ 及び $R^3$ が水素原子を表し、 $n$ が5であり、  
 $Z$ がアミノ酸残基数1～3程度のアミノ酸又はペプチドである化合物； $R^2$ 、 $R^3$   
20 が塩素原子を表し $R^1$ 及び $R^4$ が水素原子を表し、 $n$ が2であり、 $Z$ がアミノ酸残  
基数1～3程度のアミノ酸又はペプチドである化合物が好ましい。

#### 用途

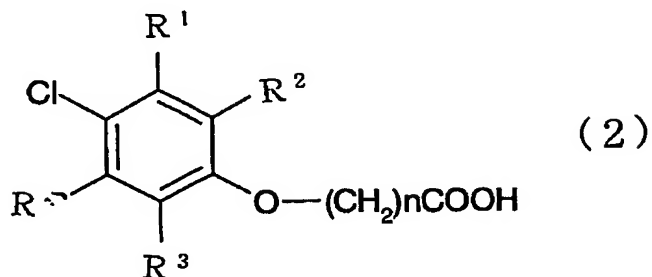
上記一般式(1)で表される化合物は、抗ダイオキシン抗体と反応することか  
ら、ダイオキシン類の免疫測定用標準品として使用できる。さらに、この化合物  
25 は毒性等価係数(TEF)を有さないため、この化合物を標準品として用いること  
により、測定者が安全に測定できるダイオキシン類免疫測定系を構築することが  
できる。

#### 製造方法

本発明のダイオキシン類測定用標準品は、それには限定されないが、例えば以

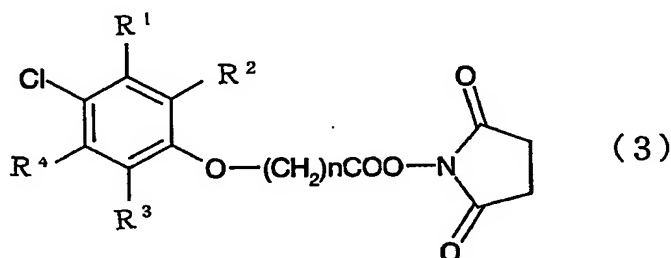
下の方法で合成できる。

以下の一般式（２）で表される化合物



- 5 (式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 $n$ は1～10の整数を表す。)

を、N-ヒドロキシスクシンイミドと反応させる活性化エステル法により活性化することにより、以下の一般式（３）で表される活性化エステル化合物



- 10 (式中、式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 $n$ は1～10の整数を表す。)  
を得る。

次いで、一般式（３）で表される化合物をアミノ酸またはペプチド等のアミノ基を含有する化合物と常法に従い反応させることにより、上記の一般式（１）で表される化合物が得られる。

- 15 出発原料である上記一般式（２）のクロロフェノール誘導体は、例えば以下の方法により合成することができる。クロロフェノール、炭酸カリウム及び6-プロモヘキサン酸エチルエステルを60℃で16時間加熱攪拌し、反応終了後、酢酸エチルで抽出し減圧下で溶媒を濃縮する。残渣をエタノールで溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加え、室温で3時間攪拌する。反応終了後、濃塩酸で中和し、  
20 反応液を減圧濃縮後、濃塩酸を加えて酸性にし、酢酸エチルで抽出した後、再結

晶を行うことにより、上記一般式（２）で表されるクロロフェノール誘導体を得られる。

#### (II) ダイオキシン類の免疫測定用キット

本発明のダイオキシン類の免疫測定用キットは本発明の一般式（１）で表される化合物をダイオキシン類定量用の標準品として含む。また、抗ダイオキシン抗体は使用者が作成してもよくこのキットに含まれていてもよいが、このキットに含まれていると便利である。抗ダイオキシン抗体については後述する。さらに、競合型測定法に供するものである場合は、競合用抗原を含んでいればよい。競合用抗原についても後述する。

その他、反応容器、容器の余剰表面を覆うためのブロッキング剤、バッファー、間接競合法に供するキットの場合は２次抗体などを含んでいてもよい。

#### (III) ダイオキシン類の免疫測定法

##### 基本的構成

本発明方法は、ダイオキシン類を定量するための免疫測定法であって、上記一般式（１）で表される化合物を標準品として用いる方法である。より詳しくは、本発明方法は、被験試料中のダイオキシン類の濃度又はさらに毒性等量を算出するための免疫測定法であって、上記一般式（１）で表される化合物を標準品として用いる方法である。

具体的には、本発明のダイオキシン類の免疫測定法は、被験試料と抗ダイオキシン抗体とを反応させることにより抗原抗体反応量を測定する工程（１）と；工程（１）における抗原抗体反応量を、濃度既知の一般式（１）で表される化合物と抗ダイオキシン抗体とを反応させることにより得られた抗原抗体反応量と比較することにより被験試料中に含まれるダイオキシン類濃度を算出する工程（２）とを含む方法である。

すなわち、本発明のダイオキシン類免疫測定法は、上記一般式（１）で表されるクロロフェノール誘導体をダイオキシン類測定の標準品として用いることを特徴とし、それ以外は、通常の免疫測定法に従って実施することができる。

本発明の化合物は公知のいずれの免疫測定法にも適用できる。このような公知の免疫測定法としては、例えば酵素免疫測定法（ＥＩＡ）、放射性免疫測定法（Ｒ

I A)、蛍光免疫測定 (F I A) 等が挙げられる。測定の簡便さから E I A が好ましい。

- 5 E I A には競合型測定法、非競合型測定法、均質法等があるが、ダイオキシン類は低分子化合物であるため、通常競合法により行なえばよい。競合法には主にマイクロプレートのウェル、チューブ等に抗原を固定化する間接競合法と、ウェルやチューブ等に抗体を固定化する直接競合法がある。

#### 間接競合法

##### (i) 競合用抗原

- 10 間接競合法においては、ウェルに固定化する競合用抗原として、ダイオキシン類又はこれらとキャリアタンパク質との複合体を用いる。樹脂製又はガラス製などの未処理の反応容器を用いる場合は、ダイオキシン類単独では容器に固定化するのが困難であるためキャリアタンパク質との複合体を用いることが好ましい。また、アミノ基又はカルボキシル基のような反応性の高い官能基で表面が活性化された反応容器を使用する場合は、ダイオキシン類単独でもこれらの官能基を介して容器に固定化することができる。キャリアタンパク質の有無にかかわらず、  
15 ダイオキシン類にはリンカーを結合させることが好ましい。これにより、立体障害が緩和されて競合用抗原と抗ダイオキシン抗体との反応性が良好になり、ひいては被験試料中のダイオキシン類の測定感度が向上する。

- 20 ダイオキシン類としては、例えばポリ塩化ジベンゾーパラージオキシン (PCDD)、ポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF)、コプラナーポリ塩化ビフェニル (コプラナー PCB) 等を使用できる。毒性のあるダイオキシン類との共通性の低いダイオキシン類又はダイオキシン様化合物を用いることにより、競合用抗原の抗ダイオキシン抗体との反応性が被験試料中のダイオキシン類との反応性より低くなり、被験試料中のダイオキシン濃度の検出感度が向上する。

- 25 キャリアタンパク質は特に限定されず公知のキャリアタンパク質を制限なく使用できる。このようなキャリアタンパク質として、KLM (Keyhole limpet Hemocyanin)、ウシ血清アルブミン (BSA : Bovine Serum Albumin) などを例示できる。

リンカーは、抗体との結合に立体障害を及ぼさないもの、反応過程において溶

解性に支障をきたさないものが好ましく、例えばポリメチレン鎖等を使用できる。リンカーはダイオキシン類若しくはダイオキシン様化合物又はこれらとキャリアタンパク質と容器との間に配置される。

さらに、競合反応用抗原として本発明の一般式(1)で表されるクロロフェノール誘導体を用いることにより高感度にダイオキシン類を定量できる。特に検量線作成用の標準品と同一の化合物を競合用抗原として使用することが好ましい。この場合は、本発明の一般式(1)で表される標準品代替化合物の末端に結合しているアミノ酸またはペプチド部分をBSA等のキャリアータンパク質に変えることにより固相化用抗原を作製することができる。

#### 10 (ii)抗ダイオキシン抗体

EIAで使用する抗体は、公知の方法に従ってポリ塩化ジベンゾーパラジオキシン(PCDD)、ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)、コプラナーポリ塩化ビフェニル(コプラナーPCB)などのダイオキシン類をハプテン化し、BSA等のキャリアータンパク質に結合させたコンジュゲートを免疫用抗原として哺乳動物に免疫することにより作製することができる(Kun Chae, et al., J. Agric. Food., 25, 1207~1209 (1977); Simona G. Merica, et al., Can. J. Chem., 73, 826~834 (1995))。

抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよく特に限定されない。抗体自身の均一性及び抗体製造時のロット差が生じ難い等の点で、モノクローナル抗体であることが望ましい。モノクローナル抗体は、ハプテン化したダイオキシン類で免疫したマウスの脾臓細胞と腫瘍細胞とを細胞融合させたハイブリドーマをクローン化した単一抗体産生細胞より得られる抗体であるが、ダイオキシン類を認識するものであればよい。

25 間接競合法は例えば次のようにして行えばよい。まず競合用抗原をマイクロプレートのような反応容器のウェル内に固相化する。次いでウェル表面の抗原が結合していない部分を牛血清アルブミン、カゼイン等の市販のブロッキング剤でブロックする。このウェルに検体と一次抗体である抗ダイオキシン類抗体を加えて、被験試料と固相化抗原を抗体に対して競合反応させる。固相化抗原と結合しな

- った抗体を洗浄除去後、同ウェルに二次抗体として例えばヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体をペルオキシダーゼ（HRP）やアルカリフォスファターゼ（ALP）等の酵素で標識した酵素標識抗体を加えて、固相化抗原と結合した一次抗体と結合させる。緩衝液で数回洗浄した後、標識酵素の基質を加えて発色した酵素反応生成物の吸光度を測定する。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合は、基質として過酸化水素、発色剤として $o$ -フェニレンジアミンやテトラメチルベンジジン等を使用すればよい。酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合は、通常基質として $p$ -ニトロフェニルリン酸を用いればよい。

- 上述の競合法において、被験試料を添加しない反応溶液の吸光度に対する、被験試料を添加することによる反応溶液の吸光度の減少量の比率を検体による阻害率として測定する。その際、本発明の一般式（１）で表される化合物をダイオキシン類標準品として用い、被験試料に代えてこの標準品の複数の既知濃度の溶液を用いた他は同様の操作で競合反応を行う。標準品の濃度と阻害率との関係を示す検量線を作成し、得られた検量線と被験試料による阻害率とを比較することにより、被験試料中のダイオキシン類濃度を標準品換算濃度として算出することができる。

#### 直接競合法

- 直接競合法においては、容器のウェル内に抗ダイオキシン抗体を固相化し、ウェルの抗体が結合していない部分を上記と同様にしてブロッキングする。次いで、このウェルに競合用の酵素標識抗原及び検体を加えることにより、被験試料及び酵素標識抗原を固相抗体に対して競合反応させる。次いで、抗体と結合しなかった酵素標識抗原を洗浄除去し、標識に使用した酵素の基質を加えて反応生成物の吸光度を測定する。

- 酵素標識抗原は、間接競合法で使用する競合用抗原と同様のダイオキシン類若しくはダイオキシン様化合物に、ペルオキシダーゼ若しくはアルカリフォスファターゼのような酵素を結合することにより調製できる。また、本発明の一般式（１）で表される化合物の末端に存在しているアミノ酸またはペプチド部分をペルオキシダーゼ若しくはアルカリフォスファターゼのような酵素に変えたものを使用する場合は感度が向上する。

なお、E I AではなくR I Aを行う場合はこれらの化合物をアイソトープで標識することにより標識抗原が得られる。またF I Aを行う場合はこれらの化合物にローダミンのような蛍光物質若しくは化学発光物質を結合させることにより標識抗原を得ることができる。

## 5 被験試料

被験試料の種類は特に限定されず、環境から採取した環境試料、生物試料、食品などの各種製品、実験用に調製したダイオキシン類溶液であってもよい。本発明方法は、特に被験試料として環境試料を用いる場合に好適な方法である。環境試料としては、例えば大気；自動車、機器、工場などからの排気ガス；土壌；河川、湖、港湾の水；燃焼灰、飛灰などが挙げられる。生物試料としては、母乳、血液、尿などが挙げられる。

### 毒性等量の算出方法

被験試料はそのまま免疫測定に供してもよく、前処理により被験試料からダイオキシンを多く含む画分を抽出してもよいが、前処理を行うことが好ましい。前処理方法を以下に例示するが、前処理方法はこれらに限定されるものではない。

#### (i) 排気ガス試料の場合

A(N m<sup>3</sup>)の被験ガスを採取し、トルエンによりガス中物質を抽出し 20ml に定量して粗抽出液とする。この粗抽出液 10ml を分取し、硫酸層の着色がなくなるまで硫酸で処理する。この溶液をヘキサンに転溶後、硫酸ナトリウム 1g、10%硝酸銀シリカゲル 1g およびシリカゲル 3g を積層した多層シリカゲルカラムにヘキサン 200ml で流通させてクリーンアップを行い、最終的に 1ml の DMSO に定量した溶液を免疫測定に供する。

得られた標準品換算ダイオキシン類濃度を下式に代入して毒性等量(TEQ)を算出する。

$$\text{TEQ}(\text{ng-TEQ/Nm}^3) = 0.0922 \times \text{標準品換算ダイオキシン類濃度} (\mu\text{g/ N m}^3)^{0.8474}$$

上記式において、0.0922 及び 0.8474 の値は、実施例において排気ガスについて本発明方法で得られたダイオキシン類濃度と公定法で得られたダイオキシン類

毒性等量との間の相関式における係数であり、被験試料毎に定められる値である。  
なお、標準品換算ダイオキシン類濃度の単位の変換は以下の式に従い行えばよい。

標準品換算ダイオキシン類濃度 ( $\mu\text{g}/\text{N m}^3$ )

$$5 \quad = \text{標準品換算ダイオキシン類濃度 (ng/ml)} \times 1/10 \times 20 \times 1/A \times 1/1000$$

(ii) 飛灰の場合

10 B(g) の飛灰を採取し、トルエンで含有化合物を抽出し、20ml に定量して粗抽出液とする。この粗抽出液 1 ml を分取してクリーンアップを行い、最終的に 2ml の DMSO に定量した溶液を免疫測定に供する。得られた標準品換算ダイオキシン類濃度を下式に代入して毒性等量 (TEQ) を算出する。

$$\text{TEQ (ng-TEQ/g)} = 0.0038 \times [\text{標準品換算ダイオキシン類濃度 } (\mu\text{g/g})]^{0.9796}$$

15 上記式において、0.0038 及び 0.9796 の値は、実施例において飛灰について本発明方法で得られたダイオキシン類濃度と公定法で得られたダイオキシン類毒性等量との間の相関式における係数であり、被験試料毎に定められる値である。

なお、標準品換算ダイオキシン類濃度の単位の変換は以下の式に従い行えばよい。

20

標準品換算ダイオキシン類濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )

$$= \text{標準品換算ダイオキシン類濃度 (ng/ml)} \times 2/1 \times 20 \times 1/B \times 1/1000$$

(iii) 土壌の場合

25 B(g) の土壌を採取し、トルエンで含有化合物を抽出し、20ml に定量して粗抽出液とする。この粗抽出液 1 ml を分取してクリーンアップを行い、最終的に 2ml の DMSO に定量した溶液を免疫測定に供する。得られた標準品換算ダイオキシン類濃度を下式に代入して毒性等量 (TEQ) を算出する。

$$\text{TEQ}(\text{ng-TEQ/g}) = 9.4553 \times [\text{標準品換算ダイオキシン類濃度} (\mu\text{g/g})]^{0.9352}$$

上記式において、9.4553 及び 0.9352 の値は実施例において飛灰について本発明方法で得られたダイオキシン類濃度と公定法で得られたダイオキシン類毒性等量との間の相関式における係数であり、被験試料毎に定められる値である。なお、標準品換算ダイオキシン類濃度の単位の変換は飛灰の場合と同様に行えばよい。

### 実施例

- 以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例 1

##### ダイオキシン類免疫反応測定用標準品の作製

- 上記一般式 (1) で示される本発明の化合物のうち、 $R^2$ 、 $R^4$  が塩素原子を表し  $R^1$ 、 $R^3$  が水素原子を表す化合物を以下の方法により合成した。合成手順を図 1 を参照して説明する。

- アルゴン気流下で、2, 4, 5-トリクロロフェノール (1) (市販品) 15.0 g (76.0 mmol)、6-プロモヘキサン酸エチルエステル 18.6 g (83.6 mmol)、炭酸カリウム 12.60 g (91.2 mmol)、無水ジメチルホルムアミド 150 ml を混合し、60℃で一晩加熱攪拌した。反応終了後、室温まで冷却し、反応液を水 450 ml に加え、酢酸エチル 225 ml で 2 回抽出した。硫酸マグネシウムを加え乾燥させた後、乾燥剤をろ別、有機層を濃縮し、粗生成物 30.7 g の淡黄色オイルを得た。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (シリカゲル 450 g、展開溶媒 酢酸エチル : n-ヘキサン = 1 : 15) で精製し、6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ) ヘキサン酸エチル(2)を 26.5 g の透明オイルとして得た (収率 100%)。

6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ) ヘキサン酸エチル(2)をエタノール 200 ml に溶解し、続いて 2 N 水酸化ナトリウム水溶液 200 ml を氷冷下で滴下し、室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、濃塩酸 70 ml で中和し、反応液を

半分になるまで濃縮した。濃縮した反応液に濃塩酸 5 ml を加えて酸性にし、酢酸エチル 100 ml で 1 回、150 ml で 2 回抽出した。次に水 200 ml、飽和塩化ナトリウム水溶液 200 ml の順で有機層を洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ別し、有機層を濃縮して粗生成物 23.3 g の白色固体を得た。粗生成物にイソプロピルエーテル 25 ml、n-ヘキサン 50 ml を加えて再結晶し、析出結晶をろ取し、イソプロピルエーテル/n-ヘキサン=1/3 で洗浄後、6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸(3)を 21.4 g の白色結晶として得た (収率 88.0%)。

6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸(3) 18.2 g (58.4 mmol) を 180 ml の塩化メチレンに溶解し、1-エチル-3-(3'-ジエチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 12.7 g (70.1 mmol) と N-ヒドロキシスクシンイミド 8.07 g (70.1 mmol) を加えた後、室温で一晩攪拌した。反応終了後、THF 1250 ml に反応液を加え、水 360 ml、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 540 ml、水 540 ml の順に有機層を洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、乾燥剤をろ別し、有機層を濃縮して粗生成物 21.9 g の白色固体を得た。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1 回目: シリカゲル 400 g、展開溶媒 塩化メチレン、2 回目: シリカゲル 330 g、展開溶媒 塩化メチレン) で精製し、スクシンイミジル-6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸ヘキサノエート(4)を 9.73 g の白色固体として得た (収率 40.7%)。

スクシンイミジル-6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸ヘキサノエート(4) 20 mg を 100 ml のジメチルスルホキシドに溶解した。その後、50 mM のグリシルグリシン水溶液 100 ml を徐々に添加し、室温で 3 時間攪拌してダイオキシン類測定用標準品溶液を得た。

また、上記操作において、出発原料として 2, 4, 5-トリクロロフェノールに代えて 2, 4, 6-トリクロロフェノール (市販品) を使用する他は同様にして、一般式 (1) において  $R^2$ 、 $R^3$  が塩素原子を表し  $R^1$ 、 $R^4$  が水素原子を表す化合物を合成した。

また、上記操作において、出発原料として 2, 4, 5-トリクロロフェノールに

代えて3, 4, 5-トリクロロフェノール（市販品）を使用する他は同様にして、一般式（1）において $R^1$ 、 $R^4$ が塩素原子を表し $R^2$ 、 $R^3$ が水素原子を表す化合物を合成した。

### 実施例 2

#### 5 競合測定用抗原の作製実施例 2

実施例 1 で作製したスクシンイミジル-6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサノ酸ヘキサノエート（4）と牛血清アルブミンを用いて競合測定用抗原を作製した。まず50 mMリン酸緩衝液（pH 8.0）に溶解した牛血清アルブミン（BSA）の溶液1 ml（BSA 15 mg（ $2.27 \times 10^{-7}$  mol）相当分）を氷冷攪拌下、ジメチルスルホキシド 545.5  $\mu$ l を加え、その後スクシンイミジルー6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサノエート（BB2-4）の20 mMジメチルスルホキシド溶液 454.5  $\mu$ l（40等量（ $9.09 \times 10^{-6}$  mol））を滴下し、室温1時間反応させた。反応後、4 LのPBSに対して透析を行い、競合測定用抗原を得た。

#### 15 実施例 3

##### 排ガス試料の調製及び公定法によるダイオキシン類TEQ値測定

公定法（JIS K 0311）に準じてごみ焼却場の排ガスを採取し、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）により試料中のダイオキシン類濃度を測定した。また、都市ごみ焼却場の煙道から、排ガス約3 Nm<sup>3</sup>をガス採取装置に吸引して採取し、採取した試料を、ろ紙、樹脂、吸収液などの形態ごとにトルエン、ジクロロメタン等の有機溶媒を用いて抽出した。これらの抽出液を合わせて20 mlまで濃縮し、粗抽出液を得た。

粗抽出液から1 ml分取し、それを硫酸処理、多層シリカゲルクロマトグラフ処理および活性炭カラムクロマトグラフ処理を行って精製した後に、ガスクロマトグラフ質量分析計（Micromass社製）によって各ダイオキシン類異性体濃度を求めた。

次に各ダイオキシン類異性体濃度にその毒性等価係数（TEF）を乗じて、排ガス試料中のダイオキシン類毒性等量（TEQ）を算出した。

一方、別に分取した粗抽出液1 mlを硫酸処理および多層シリカゲルクロマト

グラフ処理を行って精製した後、有機溶剤を乾固してジメチルスルホキシド (DMSO) 2 ml に転溶し、EIA評価用試料とした。

#### 実施例 4

#### 間接競合法による抗ダイオキシンモノクローナル抗体を用いた排ガス試料の毒性

##### 5 等量の測定

実施例 2 で作製した競合測定用抗原を PBS で  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  になるように溶解し、96穴アッセイプレート (Costar社製, Cat No. 3590) の各ウェルに、この溶液を  $100 \mu\text{l}$  ずつ分注し、プレートをシールで密閉して、 $4^{\circ}\text{C}$  で 18 時間静置して固相化を行なった。抗原溶液を除去後、0.05% Tween 20 を含む PBS にて 3 回洗浄し、5 倍希釈したブロッキング溶液 (ナカライテスク製) を  $300 \mu\text{l}$  ずつ分注し、プレートをシールで密閉し、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩静置してブロッキングを行い、ダイオキシン類測定用プレートを作製した。このプレートを用い次のようにしてダイオキシン類の免疫測定を行なった。

15 実施例 1 で作製したダイオキシン類標準品は、Triton X100 を 0.01% 含む 50% DMSO で、 $0 \sim 0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲の希釈系列を作製した。実施例 3 で調製した排ガス試料は DMSO に転溶後、Triton X100 を 0.01% 含む 50% DMSO で希釈を行い測定用試料とした。

20 一方、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを無血清培地中で炭酸ガス培養容器内において  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 週間以上培養し、培養上清を取得し、得られた培養上清をプロテイン A カラムを用いてアフィニティクロマトグラフィーにより精製した後、PBS 中で透析し、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体を調製した。

25 ダイオキシン類標準品の希釈系列及び排ガス試料をダイオキシン測定用プレートにそれぞれ  $50 \mu\text{l}$  ずつ添加し、0.2% BSA を含む PBS で  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  になるように希釈した抗ダイオキシンモノクローナル溶液を  $50 \mu\text{l}$  ずつ添加し、 $4^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。反応後、ウェルに添加した溶液を除去し、プレートを Tween 20 を 0.005% 含む PBS で 3 回洗浄した後、0.2% BSA を含む PBS で 2000 倍に希釈したヤギ抗マウス IgG (H+L) HRP 標識抗体 (アフィニティ精製したもの、DAKO社製)  $100 \mu\text{l}$  を分注し

た。プレートを室温で1時間静置した後、Tween 20を0.05%含むPBSで3回洗浄し、各ウェルにHRP基質であるTMB (BioFX社製)を100  $\mu$ lずつ分注し、30分間室温で静置した。各ウェルに100  $\mu$ lずつ0.5 M硫酸溶液を添加し、マイクロタイター用分光光度計で波長455 nm (対照6  
5 55 nm)の吸光度を測定した。

ダイオキシン類標準品を用いることにより得られた吸光度データより標準曲線(検量線)を作成し、排ガス試料を用いた場合の吸光度データを標準曲線に当てはめて、試料中のダイオキシン量を標準物質濃度に換算して算出した。

得られた標準曲線を図2に示す。図2において、Bは標準品存在下での吸光度  
10 であり、 $B_0$ は標準品非存在下での吸光度である。

また実施例3においてGC-MSを用いた定量により得られたダイオキシン類毒性等量と、実施例4において本発明の標準品を用いて免疫測定を行なうことにより得られた試料中ダイオキシン類濃度との相関関係を図3に示す。図3から明らか  
15 なるように、本発明の免疫測定用標準品を用いた排気ガス試料の免疫測定法による測定値と、公定法である機器分析法から算出されたダイオキシン類毒性等量との間に良好な相関性( $R^2=0.985$ )が認められた。

#### 実施例 5

##### 飛灰試料の調製及び公定法によるダイオキシン類TEQ値測定

飛灰について、実施例3と同様にしてGC-MSの結果から毒性当量を算出し  
20 た。

#### 実施例 6

##### 間接競合法による抗ダイオキシンモノクローナル抗体を用いた飛灰試料の毒性等量の測定

実施例4と同様にして、EIAにより飛灰試料中のダイオキシンの毒性等量を  
25 測定した。

実施例5においてGC-MSを用いた定量により得られたダイオキシン類毒性等量と、実施例6において本発明の標準品を用いて免疫測定を行なうことにより得られた試料中ダイオキシン類濃度との相関関係を図4に示す。図4から明らかなように、本発明の免疫測定用標準品を用いた飛灰試料の免疫測定法による測定値と、

公定法である機器分析法から算出されたダイオキシン類毒性等量との間に良好な相関性 ( $R^2=0.990$ ) が認められた。

#### 実施例 7

##### 土壌試料の調製及び公定法によるダイオキシン類 T E Q 値測定

- 5 土壌について、実施例 3 と同様にして G C - M S の結果から毒性当量を算出した。

#### 実施例 8

##### 間接競合法による抗ダイオキシンモノクローナル抗体を用いた土壌試料の毒性等量の測定

- 10 実施例 4 と同様にして、E I A により土壌試料中のダイオキシンの毒性等量を測定した。

- また実施例 7 において GC-MS を用いた定量により得られたダイオキシン類毒性等量と、実施例 8 において本発明の標準品を用いて免疫測定を行なうことにより得られた試料中ダイオキシン類濃度との相関関係を図 5 に示す。図 5 から明らか  
15 ないように、本発明の免疫測定用標準品を用いた土壌試料の免疫測定法による測定値と、公定法である機器分析法から算出されたダイオキシン類毒性等量との間に良好な相関性 ( $R^2=0.992$ ) が認められた。

- なお、ここでは一般式 (1) において  $R^2$ 、 $R^4$  が塩素原子を表し  $R^1$ 、 $R^3$  が水素原子を表す化合物について公定法との相関性を検討したが、実施例 1 において  
20 合成した一般式 (1) において  $R^2$ 、 $R^3$  が塩素原子を表し  $R^1$ 、 $R^4$  が水素原子を表す化合物、及び、一般式 (1) において  $R^1$ 、 $R^4$  が塩素原子を表し  $R^2$ 、 $R^3$  が水素原子を表す化合物についても、実施例 2 ~ 8 と同様の操作を行ったところ、ダイオキシン類の毒性等量について公定法との間に高い相関性が認められた。

#### 産業上の利用可能性

本発明の化合物及び方法は、土壌、大気、排気ガス、湖水又は河川のような環境試料；母乳、血液、尿のような生物試料；食品のような製品などに含まれるダイオキシン量の定量に好適に使用できる。

図面の簡単な説明

図 1 は、実施例 1 によるダイオキシン類の免疫測定用標準品の合成スキームを示す図である。

図 2 は、本発明の 1 実施例であるダイオキシン類免疫測定用標準品を用いて得られた標準曲線を示す図である。

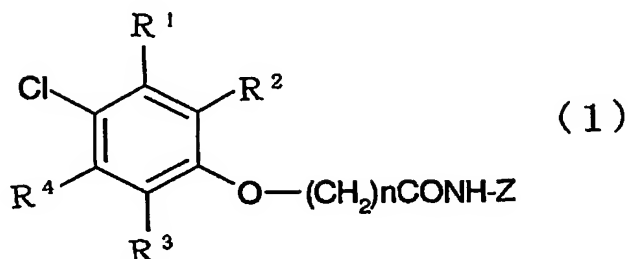
図 3 は、ガスクロマトグラフ質量分析による排ガス中のダイオキシン毒性等量の測定量と、本発明のダイオキシン類免疫測定用標準品を用いた免疫測定法による排ガス中のダイオキシン類濃度との相関を示す図である。

図 4 は、ガスクロマトグラフ質量分析による飛灰中のダイオキシン毒性等量の測定量と、本発明のダイオキシン類免疫測定用標準品を用いた免疫測定法による飛灰中のダイオキシン類濃度との相関を示す図である。

図 5 は、ガスクロマトグラフ質量分析による土壌中のダイオキシン毒性等量の測定量と、本発明のダイオキシン類免疫測定用標準品を用いた免疫測定法による土壌中のダイオキシン類濃度との相関を示す図である。

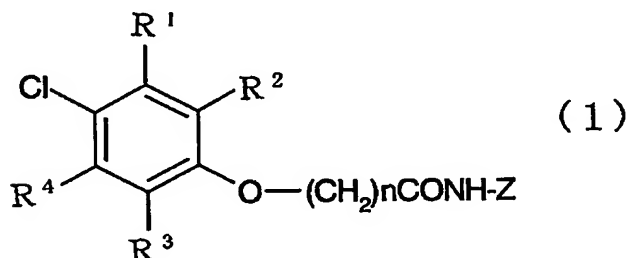
## 請 求 の 範 囲

1. 以下の一般式（1）で表される化合物。



- 5 (式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 $n$ は1～10の整数を表し、 $Z$ はアミノ酸残基又はペプチドを表す。)

2. 以下の一般式（1）で表されるダイオキシン類の免疫測定用標準品。



- 10 (式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 $n$ は1～10の整数を表し、 $Z$ はアミノ酸残基又はペプチドを表す。)

3. 請求項1に記載の化合物を含むダイオキシン類の免疫測定用キット。
4. さらに、抗ダイオキシン抗体を含む請求項3に記載のキット。
5. さらに、競合用抗原を含む請求項3又は4に記載のキット。
6. ダイオキシン類を定量するための免疫測定法であって、請求項1に記載の
- 15 化合物を標準品として用いる方法。
7. 免疫測定法が、酵素免疫測定法、放射性免疫測定法及び蛍光免疫測定法から選ばれる方法である請求項6に記載の方法。
8. 被験試料中のダイオキシン類の濃度又はさらに毒性等量を算出するための免疫測定法であって、請求項1に記載の化合物を標準品として用いる方法。
- 20 9. 免疫測定法が、酵素免疫測定法、放射性免疫測定法及び蛍光免疫測定法から選ばれる方法である請求項8に記載の方法。

10. 被験試料と抗ダイオキシン抗体とを反応させることにより、抗原抗体反応量を測定する工程(1)と、

5 工程(1)における抗原抗体反応量を、濃度既知の請求項1に記載の化合物と抗ダイオキシン抗体とを反応させることにより得られた抗原抗体反応量と比較することにより被験試料中に含まれるダイオキシン類濃度を算出する工程(2)とを含むダイオキシン類の免疫測定法。

11. 抗原抗体反応量を、酵素免疫測定法、放射性免疫測定法及び蛍光免疫測定法から選ばれる方法で測定する請求項10に記載の方法。

1/5

図 1

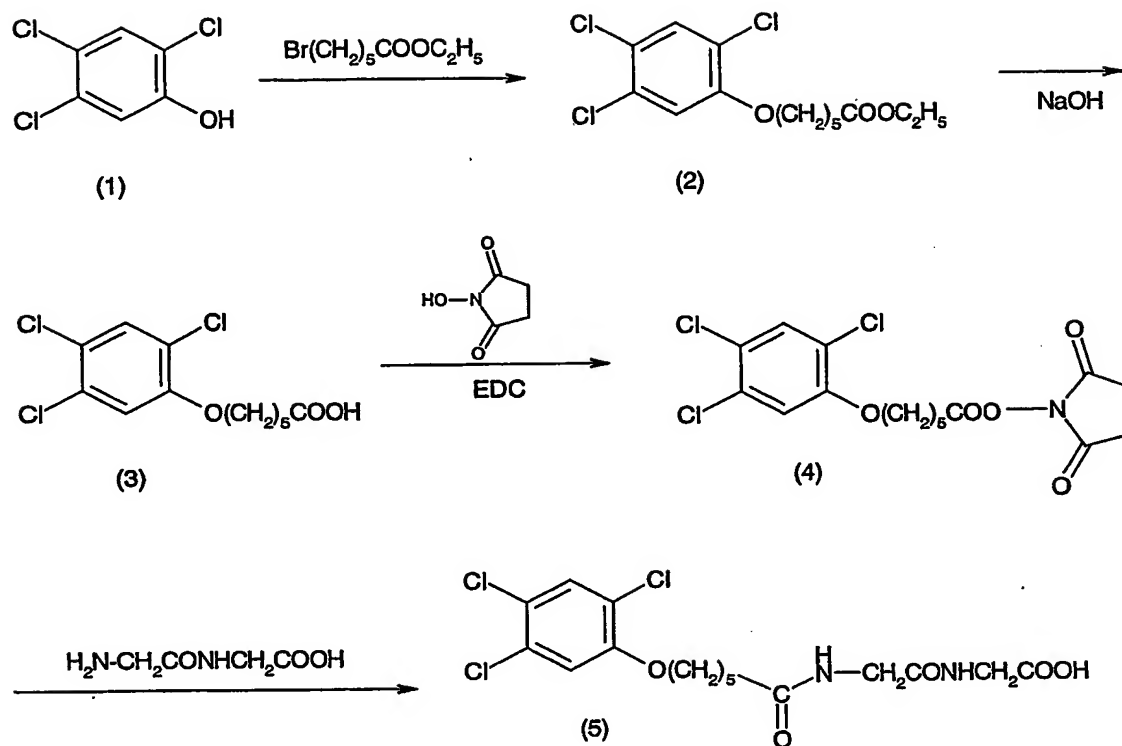
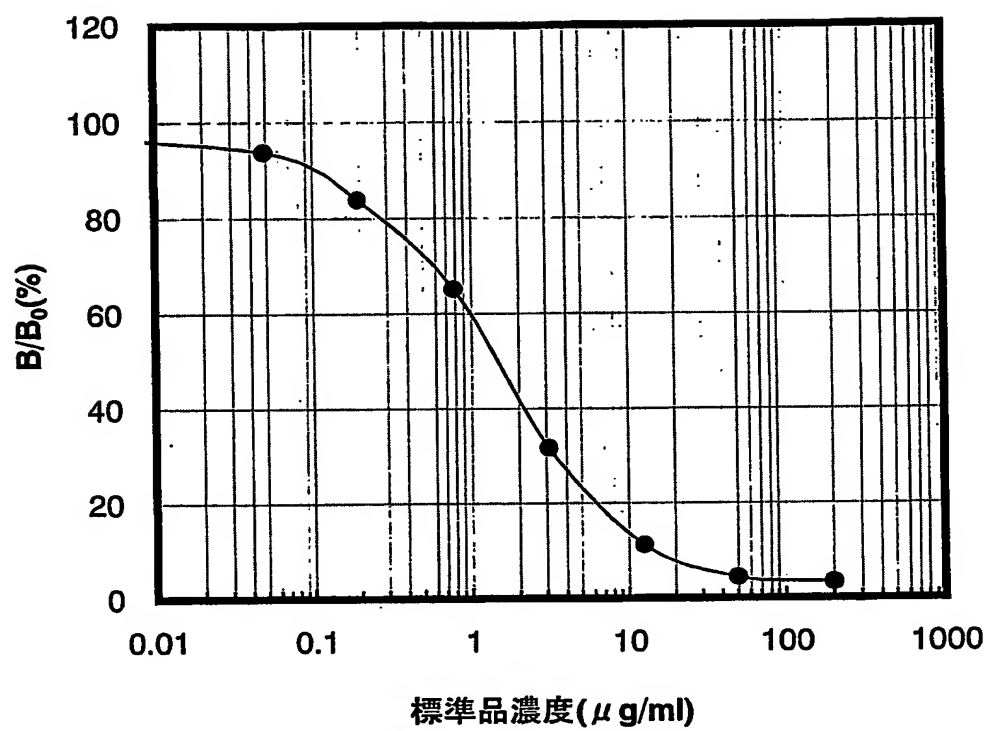


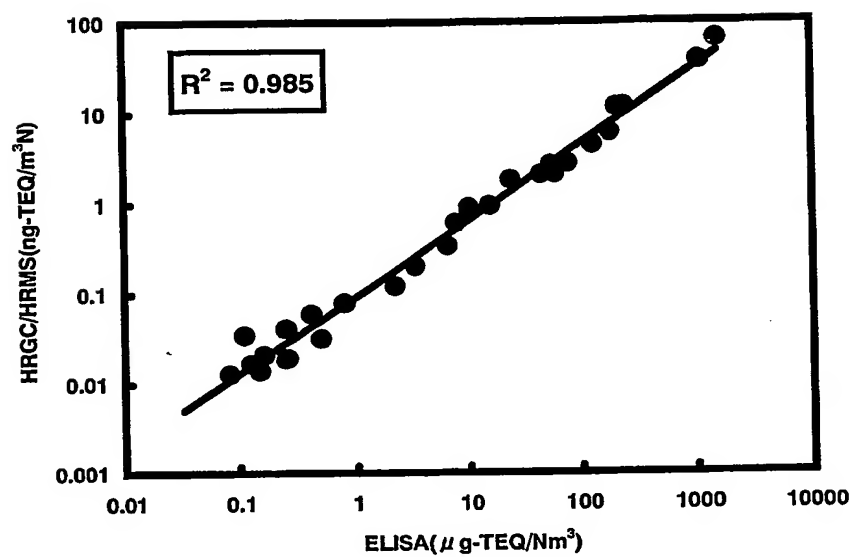
図 2



3/5

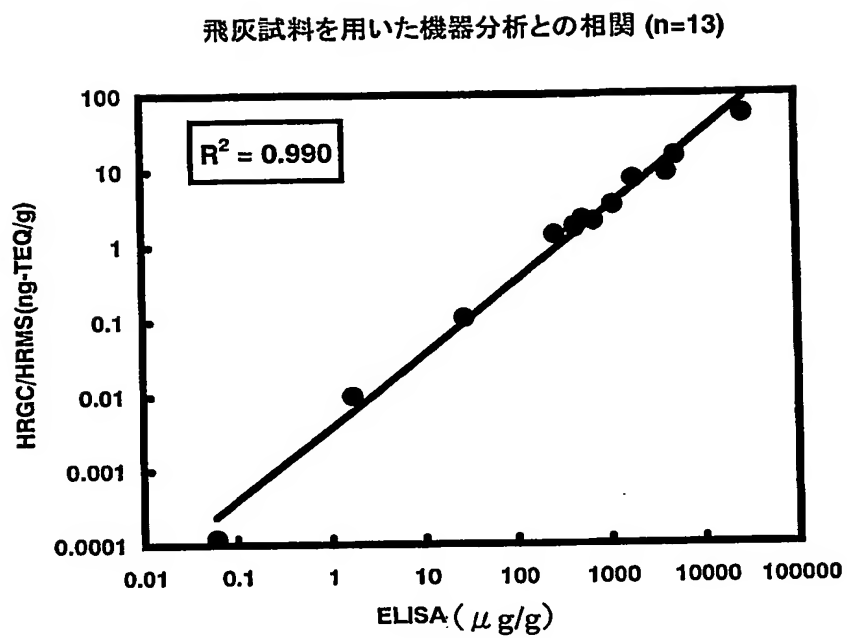
図 3

排ガス試料を用いた機器分析との相関 (n=29)



4/5

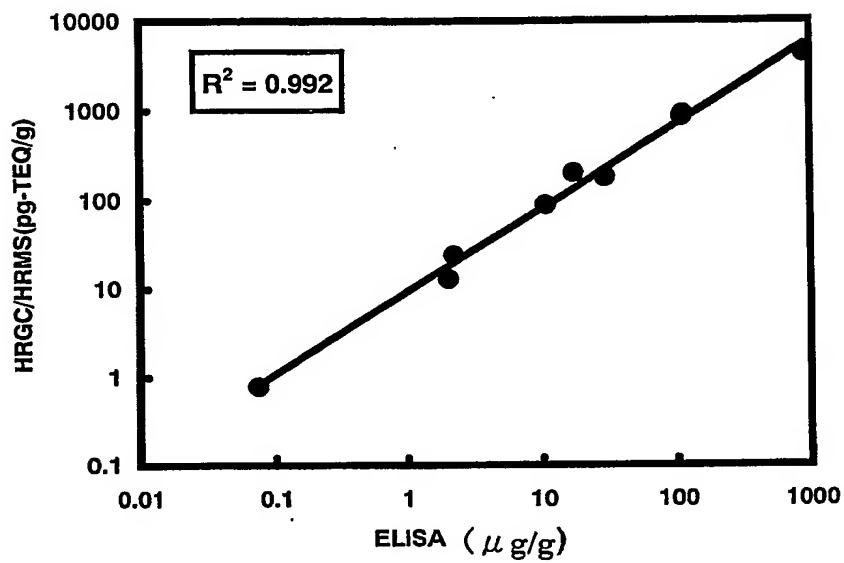
図 4



5/5

図 5

土壌試料を用いた機器分析との相関 (n=9)



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10394

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07C235/20, C07K5/062, G01N33/53, G01N33/531

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07C235/20, C07K5/062, G01N33/53, G01N33/531

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	ARJMAND, Masood et al., Metabolism of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. 8. Gasliquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of amino acid conjugates., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1976, Vol.24, No.3, pages 574 to 580	1 2-11
X A	KELLEY, Michael et al., The effect of pretreatment with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the hepatic metabolism of 2, 4, 5-trichlorophenoxy acetate (2, 4, 5-T) and 2, 4-dichlorophenoxy acetate (2, 4-D) Toxicology and Applied Pharmacology, 1987, Vol.91, No.2, pages 295 to 298	1 2-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
14 October, 2003 (14.10.03)

Date of mailing of the international search report  
04 November, 2003 (04.11.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/10394

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	MITCHUM, R.K. et al., Application of Negative Ion Atmospheric Pressure Ionization (NI-API) mass spectrometry for trace analysis Advances in Mass Spectrometry, 1980, No.8B, pages 1415 to 1421	1 2-11

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C07C235/20, C07K5/062, G01N33/53, G01N33/531

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C07C235/20, C07K5/062, G01N33/53, G01N33/531

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	ARJMAND, Masood et al., Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. 8. Gas liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of amino acid conjugates Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1976, Vol. 24 No. 3, p. 574-580	1 2-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 10. 03

国際調査報告の発送日

04.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本堂裕司

4H

9049

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

## C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	KELLEY, Michael et al., The effect of pretreatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the hepatic metabolism of 2,4,5-trichlorophenoxyacetate (2,4,5-T) and 2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D) Toxicology and Applied Pharmacology, 1987, Vol. 91 No. 2, p. 295-298	1 2-11
X A	MITCHUM, R. K. et al., Application of Negative Ion Atmospheric Pressure Ionization (NI-API) mass spectrometry for trace analysis Advances in Mass Spectrometry, 1980, No. 8B, p. 1415-1421	1 2-11